Rhizoctonia solani の土壌中における消長について*

Ⅲ. 菌株間における腐生能力のちがい

宇井 格 生**・生 越 明**

Tadao UI and Akira OGOSHI: Studies on vicissitude of *Rhizoctonia solani* Kühn in soil. Part III. Saprophytic ability of different strains.

Abstract

The competitive saprophytic ability of *Rhizoctonia solani* Kühn was compared among three different strains: i.e., isolate F-16 which belongs to the spring strain, F-20 which belongs to the summer strain, both being obtained in the previous experiments (Ui et al, 1963), and B-5, a sugar beet strain which causes damping off of sugar beet seedlings and root rot of mature plants. For the assessment of the competitive saprophytic ability, the Cambridge method (Butler, 1955) and its agar plate modification (Rao, 1959) were adopted. The substrate for saprophytic colonization of the inoculant were mature flax stem pieces and water agar plate respectively. From the results, as illustrated in the figures presented, F-20 may be regarded as a vigorous saprophyte, followed by B-5 and F-16. When the same estimations were applied to the soil-inoculum mixtures which were previously incubated for two weeks at room temperature before the addition of substrates, the saprophytic ability of F-20 showed little changes, while that of B-5 and F-16 decreased, particularly the latter behaved as a poor saprophyte. From the results of the experiments, the authors concluded as follows: *R. solani* has been regarded as one of the typical soil-inhabiting fungi, whereas some of the strains such as F-16, behave as a poor saprophyte when it was previously incubated for several days under competition of soil micro-organisms without a suitable substrate for colonization.

(Received November 19, 1965).

土壌伝染性病原菌の一つである *Rhizoctonia solani* Kühn は、その菌糸が自然土壌中を生長し¹⁾、土壌中のセルローズを他の土壌微生物との競争下で利用すること²⁾など、土壌棲息菌の典型的なものとしてされている³⁾。この菌が、自然土壌や接種土壌の中で、土壌微生物との競争に打ち勝つて、死んだ植物組織片に腐生的着生 (saprophytic colonization) すること^{6,13)}は、腐生能力 (competitive saprophytic ability) の強いことを示している。しかし、この菌は転流性糸状菌¹⁰⁾に属し、菌糸は着生基質からの栄養に依存して生長し、不完全な組成の寒天培地、あるいは水道水寒天

の上を長い距離にわたって生長することができる¹⁶⁾。この性質から、畑土壌中に見られる菌糸の生育は、着生基質にもつばら依存しており、植物の生育しない裸地土壌では菌糸の生長が見られないともされる¹⁷⁾。13種の土壌伝染性病原菌について、モデル実験により腐生能力を検討した結果⁹⁾、*R. solani* は腐生能力の最も弱いものの一つであるという意外な結果が得られ、それは、供試条件下における土壌微生物の拮抗作用が自然土壌中におけるよりもはるかに強く働いたためであると説明された。

R. solani の腐生的活動についての実験、観察の結果がこのようにことなっている原因の一つとして、使用する系統のちがう点があげられる。事実、同一の分離菌株の担子孢子から得た多くの単胞分離菌株について比較した結果、それら菌株間に、形態、培養性質の

* 分類学的見地から前報までの表題中 *Pellicularia filamentosa* を *Rhizoctonia solani* とする

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

ちがい⁹⁾のみならず、腐生能力、耐久生存期間など、土壌中の腐生の活動にも差異のあることが明らかにされている⁷⁾。一つの畑土壌について見ても、その中に性質をことにする多くの菌株、系統が存在し、それらの活動は季節、あるいは時期的に変動がある^{13, 16)}。例えば、アマ畑土壌中で、春から初夏にかけて活動するものは“春型菌”で、その後には“夏型菌”が現われる。両者は、生理的、形態的のみならず、病原性も異なり、前者は苗立枯をおこすが、後者は開花成熟したアマの茎の地際部のみに寄生する¹³⁾。これら、生態的に性質を異にする系統間の土壌中における腐生の活動の差異を比較、検討することは、既往の研究における矛盾を説明しうるのみならず、畑における菌系統の交代活動消長の原因を明らかにするための手がかりをもうることができる。

実験方法

供試菌株——F-16, F-20 および B-5 の *R. solani* 三菌株を比較に用いた。F-16: 札幌市北大農場アマ畑から分離した菌で、春型菌の典型で、アマ子苗などの立枯をおこす。F-20: 同じ圃場から分離した菌株で、代表的夏型菌、開花後の成熟したアマ茎のみを侵害する。B-5: テンサイ子苗、肥大した根部に病原性を有す、テンサイ根腐病菌株である。

接種源と接種法——500 cc コルベンにパーミキュライト 35 g, トウモロコシ粉末 5 g を加え充分混合、これに水 100 cc を加え加圧殺菌したものに *R. solani* を 25°C, 3 週間培養する。これを接種源として自然土壌に対し容量比で 2, 10, 50, 90 % などの割合で混合し、inoculum potential をことにする接種土壌をつくる。供試土壌は、殺菌しない火山灰性砂質壤土である。なお、接種しない土壌、接種源のみをそれぞれ土壌対照、接種源対照とした。接種土壌は直ちに 9 × 9 cm 腰高シャーレに入れ、土壌湿度を最高容水量の約 40 % とし、散光下の室内で実験を行なった。

接種土壌より菌の検出——Rao⁹⁾ の寒天平板法に準拠した。すなわち、接種土壌 5 g を取り、シャーレの中に拡げ、その上に固化寸前の脱塩水寒天培地（以下 W.A. と呼ぶ）10 cc を流し込み、土壌平板をつくり、これから径 10 mm のコルクボーラーで土壌円板を抜き取る。この円板を、pH 4.5 とした W.A. 平板上におき、一定期間後、*R. solani* 菌糸の伸長した円板の割合を求め、これを一応検出率として表わした。別の表現を用いれば、W.A. 平板に対する *R. solani* の着生率 (colonize 率) ということになる。Rao の方

法とことなるところは、菌の検出にツァベック平板培地の代りに酸性 W.A. を用いた点だけである。

アマ茎に対する腐生の着生の比較——収穫、乾燥したアマ茎を、長さ約 3 cm に切り、プロビレンオキサイドで殺菌、これを各土壌の中に垂直に埋め、2 日間保つ。のち土壌から取り出し、充分水洗いし、酸性 W.A. 平板上に並べ、それから *R. solani* 菌糸の生長したものの割合を、腐生の着生率とした。

土壌中における菌糸の活動——各土壌中の菌糸の活動状況を、埋没スライド法により、スライド表面に付着した菌糸片数の多少から比較した。

以上 3 種の検討を、接種直後の土壌と、接種後 2 週間何ら処理せず室内に保つた別の土壌について行なった。その結果を横軸に接種量を便宜上対数目盛にとり、縦軸は基質着生率、菌糸片数などとしたグラフとして現わし、そのグラフの傾向から Garrett⁴⁾ の基準に従い腐生能力の強弱を判定し、菌株間の比較を行なった。

実験 1

土壌に対する接種量を 2, 10, 50, 90 % とし、接種源密度 (inoculum potential) のことなる土壌について行なった実験の結果を、各菌株ごとにまとめて記すと次のとおりである。

F-16——接種直後の土壌から寒天円板法により菌の再分離を行なうと (Fig. 1, F-16 A), 接種源密度 (以下接種量と呼ぶ) 2 % のとき、菌は検出し得なかつた、接種量がそれ以上になると、その増加に伴って検出率は高くなり、10 % のとき検出率約 60 %, 50 % 以上ではほとんど 100 % になる。接種後 2 週間放置した土壌では、菌の検出はすべて不良となり、接種直後行なった値の約 1/10 となる。次に、土壌に入れたアマ茎に対するこの菌株の腐生の着生率と、接種量との関係を見ると (Fig. 1, F-16. B), 接種量 2 % のとき着生率は約 10 %, 90 % では 92 % と、接種量の増加に伴い着生率は明らかに増加する。しかし、接種後 2 週間たつた土壌では、菌の活動は低下し、接種量 50 % までの土壌では、菌はアマ茎に着生することがない。これらの結果から菌株 F-16 は無殺菌土壌に加えられたとき、接種直後にはまだその活動は旺盛で、検出率も高く、また土壌に加えた基質を腐生的に利用することができ、土壌微生物との競争で優位に立っている。しかし、接種後 2 週間経過する間に、この菌は土壌中で次第に静止状態となるか、あるいは土壌微生物によりその活動が抑制され、その結果腐生能力は低下する。しかし、埋没スライド法の結果から判断すると (Fig.

Fig. 1 Saprophytic activities of *Rhizoctonia solani* (strains F-16, F-20 and B-5) in soil-inoculum mixtures. Inoculum: vermiculite corn-meal cultures, incubated for three weeks. A: Saprophytic colonization of water agar plate. B: Saprophytic colonization of flax stem pieces. C: Number of hyphal fragments attached on the surface of slide, placed vertically in the soil-inoculum mixtures. ●.....●: colonization of substrates, incorporated into the soil-inoculum mixtures immediately after they were mixed. ○.....○: saprophytic colonization of substrates incorporated into the mixtures, which were previously incubated two weeks after they were mixed.

1, F-16.C), 接種2週間後に, 菌糸の活動は明らかに低下はしているが, アマ茎に対し腐生的着生が見られない状態, すなわち, 接種量 10~50% の土壤中でも性菌糸の活動が認められ, 菌が完全に休止, あるいは死滅しているのではないことが知られる。

F-20—接種土壤から菌の検出を行なうと (Fig. 1, F-20.A), 検出率は F-16 に比べ極めて高く, 接種量 10%以上の土壤からの検出率はすべて 100%であり, 2週間放置した土壤でも, その検出率はほとんど低下しない。また, アマ茎に対する腐生的着生率 (Fig. 1, F-20.B) も, 検出率と同様極めて高く, 接種量 10%以上のとき, 総てのアマ茎に着生が見られる。接

種後2週間おいたのち, この菌株の腐生的着生は, 最初に比べ, やや変動はあるが, F-16に見られるような着生率の低下は見られない。土壤中の菌糸生長も極めて旺盛で (Fig. 1, F-20.C), 埋没スライド表面に多数の菌糸が付着し, スライドを土壤から取り出すとき, 硝子面から離脱するものが多く, そのため接種量, 接種期間のちがいによる菌糸活動の差異を量的に比較することは難しい。以上のように, 接種量の少ない土壤中でも検出率, 基質着生率いずれも極めて高い本菌は, 接種後2週間の間, 土壤微生物との共存下においてもその活性はほとんど低下しない。すなわち, F-20は, F-16とことなり, 土壤微生物の拮抗に対し極

Fig. 2 Saprophytic activities of *Rhizoctonia solani* in soil-inoculum mixtures. Inoculum: vermiculite corn-meal cultures, incubated two weeks. The explanation of figures are the same as in Fig. 1.

めて強いと同時に土壌中で長く腐生的活動を続けうることを示している。

B-5—F-16, F-20 の 2 菌株とは、分離源、培養性質などの全く異なるこの菌株について検討した結果は (Fig. 1, B-5), 検出率, 基質着生率いずれも F-16 とほぼ同様の傾向が認められる。やや異なる点は, 接種量 50% 以上の際, F-16 よりも検出率, 着生率が高くなり, 埋没スライドの菌糸片数が多いことである。しかしながら, いずれの接種量の場合にも, F-20 より高い数値を示すことがない。これらの結果, 腐生能力は $F-20 > B-5 \geq F-16$ となる。

実験 II

若い接種源, すなわち, パーミキュライト・トウモロコシ粉末培養に 13 日間培養し, 菌核のほとんど形成されていないものを接種源とし, 前と同様の実験を行なった。またその際, 接種源は前と同様, 土壌に対し容量比で添加混合しているが, 常用培地である川砂・

トウモロコシ粉末培養のように比重の重いものに比べると, 接種量が過剰になるきらいがある。そのため接種量の低い土壌を除外しているおそれもある。そこで前回よりも接種量をさらに細くとり, 1, 2, 5, 25, 50, 90% として実験を行なった (Fig. 2)。

寒天平板法により各接種土壌から菌の検出される割合は, 各菌株とも前回の実験とほぼ同じ傾向を示し, 検出率 100% となるときの接種量は F-16 では 90%, F-20 は 10%, B-5, 25% である。接種量の増加に伴う検出率増加傾向のグラフから判定すると, F-20 は腐生能力の極めて強いことが明らかで, F-16 のそれは中程度, B-5 はこれとほぼ等しいか, やや強いと見なされる。また, アマ茎に対する腐生的着生率は, 3 菌株とも接種量 1% の場合, 着生率はすでに 100% となり, 極めて強い腐生能力を示している。すなわち, この種接種土壌では 3 菌株とも活性高く, とくにアマ茎に対する腐生的着生は旺盛である。菌株間の腐生能

力を総合的に判断すると、 $F-20 > B-5 \geq F-16$ の順である。

接種後2週間土壌を放置したとき、 $F-20$ ではその土壌からの検出率、基質の腐生の着生率いずれも接種直後の土壌におけると変わりなく、 $B-5$ では、前回の実験と同様、明らかな低下が認められる。 $F-20$ が若い培養を接種源としたときも、古い培養を用いたときも、土壌中の活性に大差は認められないのに対し、 $F-16$ は、若い接種源を用いたとき、接種後2週間の間に腐生的な活動は全く低下して、分離も、基質の着生もほとんど見られなくなつた。このことは生育の比較のおそい $F-16$ は、接種源とした培養中の菌量が不充分であつたことも原因すると考えられるが、接種直後の土壌では腐生的活動が極めて旺盛なところから、必ずしも当を得ている説明とはなり得ない。やはり、接種後2週間の間に土壌微生物の活動、また菌自身の持つ内的な要因により活動が低下したと考えられる。

結 論

土壌棲息菌が、土壌中で植物遺体などを利用し得るのは、その菌が遺伝的に持つている腐生能力による⁸⁾。種間腐生能力の比較は、コムギに寄生する4種の病原菌について試みられ^{2,9)}、この方法は、のちにケンブリッジ法と名付けられた⁸⁾。ここに記した実験のうち、接種直後の土壌についてのアマ茎に対する腐生的着生の検討は、ケンブリッジ法に他ならない。*Garrett* による腐生能力検討の基準¹⁵⁾から、供試3菌株の腐生能力を判定すると、 $F-20 > B-5 \geq F-16$ の順になる。しかし、 $F-16$ は、2回の実験でやや傾向の異なる点もあるが、腐生能力の極めて弱いものであるとは結論し難い。また、同じくここで行なつた接種土壌中の菌の検出法は、*Rao*⁹⁾ の試みたケンブリッジ法の変法である。ただ、同氏が接種土壌でつくつた土壌寒天円板をツァベック寒天平板上におき、菌の検出率を求めたのに対し、上記の実験では土壌寒天円板を純水を用いた *W.A.* 平板上においた点が異なっている。このような実験で、土壌寒天円板中の *R. solani* と土壌微生物の間で起ると考えられる競争は、土壌寒天円板中における両者の拮抗の他に、円板をおく平板培地の栄養 (*Rao* の方法ではツァベック培地) に対する両者の競争がある。*W.A.* を用いたこの実験では、*W.A.* すなわち栄養のほとんど含まれない基質栄養の取り合いということは考えられないから、土壌円板からの検出が多いものは、その中に存在する微生物の拮抗に対し強く、かつその中での栄養でまかなわれて *W.A.* 平板上へ生長

の速かなものであると見なすことができる。ところで3菌株の *W.A.* 上における生育を比較すると、菌糸が15 cm 伸びるに要する日数は、 $F-20$: 7.4 日、 $B-5$: 4.9 日、 $F-16$: 11 日、すなわち、生育の速さは $B-5 > F-20 > F-16$ の順になる。しかし、*W.A.* 上での検出率から総合すると、3菌株の土壌微生物との競争に対する強さは、 $F-20 > B-5 > F-16$ の順である。この結果は、必ずしも菌糸生長の速かなものが寒天平板上への生育が旺盛であるとはいえないことを示している。

ケンブリッジ法における接種源の *vigour* のちがいが、菌の腐生的な活動に大きな影響をおよぼすことが示唆され⁹⁾、*R. solani* について検討されたところでは、*Rao* の寒天平板法による腐生能力は、接種源の培養期間が14日ないし42日のものでは何ら見るべき差がないとされる⁹⁾。この実験でも、培養2週間目のものと、3週間目のものを接種源としたとき、寒天平板上における検出率は大差が認められないが、アマ茎を基質としたとき、それに対する腐生的な着生は3菌株とも若い接種源を用いたときの方が旺盛で、菌株間に著しい差は認め難くなる。しかし、このような接種土壌を2週間室内に放置するとき、接種した *R. solani* と土壌中の微生物との間の競争によつて、菌株間に顕著な差が現われる。この点について、*Ophiobolus graminis* と *Fusarium culmorum* とを用いた実験の結果から、根系棲息菌である前者はその間に土壌微生物の拮抗により腐生能力は低下するが、土壌棲息菌である後者は増加するとされる⁹⁾。しかし、その実験結果を検討すると、土壌棲息菌とされる *F. culmorum* も、着生基質としたコムギ稈に糖、あるいは NO_3 塩を強化したときのみ着生が増加し、何等物質を添加しない稈に対しては低下していることが明らかである。これに比べ *R. solani* 3菌株のうち2菌株は、土壌に接種後2週間放置するとき、その腐生的活性は低下するが、 $F-20$ はほとんど低下しない。すなわち、 $F-20$ は土壌中で腐生能力を維持することができる菌であり、 $F-16$ 、 $B-5$ 両菌株は、次第に腐生能力の低下するものである。しかし、これらの菌株が、土壌中で微生物の拮抗により死滅したとは考え難く、菌株のもつ内的な要因、あるいは微生物の作用などによつて休止状態となつたものと考えられる。それら要因についてはなお検討を要するが、土壌棲息菌の代表とされる *R. solani* でも、裸地土壌中で速やかに休止状態となる $F-16$ のような菌株のあることが知られる。すなわち、以上3菌株の腐生能力を総合的に判断すれば $F-20 >$

B-5>F-16 の順となる。

摘 要

1. 生態的に活動季節の異なる *Rhizoctonia solani* 3 菌株について、土壤中における腐生的性質の差異を検討した。

2. パーミキュライト・トウモロコシ培地に培養した菌を、無殺菌土壤に種々の割合で混合し、inoculum potential の異なる土壤をつくり、これら接種土壤を接種直後および室内に 2 週間放置したのち、それぞれ実験に供した。

3. 接種した土壤中における菌株の腐生能力および生育の状況を、アマ茎の小片に対する菌の着生率 (colonization 率)、Rao (1959) の寒天平板法による菌の検出率および、埋没スライド表面に付着した菌糸片数から比較した。

4. 接種直後の土壤では、接種量の増加に伴う着生率、検出率の増加の傾向は、菌株により異なる。増加傾向から判断して、3 菌株間で腐生能力 (Garrett, 1956 の定義による) は F-20 が最も強く、次いで B-5, F-16 である。

5. 接種後 2 週間放置した土壤中における腐生的活動は、接種直後と比べ F-20 はほとんど変化しないが、B-5 は明らかに低下し、F-16 はいちじるしく低下する。ことに若い培養を接種源としたとき、その低下は極端である。しかし、F-16 がこの間に死滅したとは認められない。

6. これらの結果から、F-20 は土壤中で高い腐生能力を持続するのに対し、F-16 は基質のないとき短期間にその能力が低下し、休止状態となる傾向をもつ菌株と見なされる。すなわち 3 菌株の腐生能力は F-20>B-5>F-16 の順となる。

引用文献

1. Blair, I.D. (1943). Ann. appl. Biol. 30 : 118-127.
2. Butler, F.C. (1953). ibid. 40 : 284-297.
3. Garret, S.D. (1956). Biology of Root-infecting Fungi, Cambridge.
4. ————— (1962). Trans. Brit. mycol. Soc. 45 : 115-120.
5. Lucas, R.L. (1955). Ann. appl. Biol. 43 : 134-143.
6. Papavizas, G.C. & C.B. Davey (1961) Phytopath. 51 : 693-699.
7. ————— & ————— (1962). ibid. 52 : 834-840.
8. ————— & (1964). Canad. J. microbiol. 10 : 739-746
9. Rao, A.S. (1959). Trans. Brit. mycol. Soc. 42 : 97-111.
10. Schütte, K.H. (1956). New Phytol. 55 : 164-182.
11. 枅内, 宇井, 鈴木, 田中 (1956). 北大農, 邦文紀要 2 : 91-100.
12. 宇井, 枅内 (1955). 日植病報 19 : 109-113.
13. 宇井, 三井, 原田 (1963). 同上, 28 : 270-279.
14. 宇井, 三井, 鈴木, 生越, 呂 (1965). 甜菜研究会研究報告 4 : 101-112
15. 宇井格生 (1964). 土壤病害の手引, II, 56-67, 東京.
16. 宇井格生 (1965). 日植病報, 投稿中.
17. Winter, A.G. (1956). Arch. Microbiol. 16 : 136-162.