



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Rhizoctonia solani Kühn によるインゲン病斑に侵入する微生物とその R. solani に対する拮抗作用
Author(s)	本間, 善久; HOMMA, Yoshihisa; 宇井, 格生 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 8(4), 405-410
Issue Date	1973-03-30
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/11847">https://hdl.handle.net/2115/11847</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	8(4)_p405-410.pdf



# *Rhizoctonia solani* Kühn によるインゲン病斑に侵入する微生物とその *R. solani* に対する拮抗作用

本間善久・宇井格生  
(北海道大学農学部植物学教室)

## Soil microorganisms invading into the lesion of bean plant caused by *Rhizoctonia solani* Kühn and their antagonistic action to *R. solani*

Yoshihisa HOMMA and Tadao Uti  
Hokkaido University, Faculty of Agriculture,  
Department of Biology  
Received August 31, 1972

### 緒言

植物に寄生し、病斑を形成した土壌伝染性植物病原菌は、病斑中で土壌微生物の影響を免がれ、生存出来るとされている<sup>4)</sup>。病斑が古くなり、あるいは寄主植物が成熟期を過ぎ、老衰、枯死する間に病斑組織やその他の部分に土壌微生物が侵入し、病原菌はそれらの作用を受けると考えられる。各種作物を侵害する *R. solani* は、インゲン幼苗の胚軸部に局部病斑を形成し、そこで生育が停止し<sup>3),9)</sup>、病斑内に組織内菌核を生ずる<sup>3),8)</sup>。病斑内にとどまる菌糸は、寄主の衰弱、枯死に伴いふたたび活動を始め、病斑以外の組織に腐生的に伸び出す<sup>8)</sup>。病斑には各種の菌類が侵入し、病斑が古くなるとその分離率は増加する。また、寄主が衰弱、枯死し、組織が分解するにつれ、病斑部からの *R. solani* の分離率は低下する<sup>8)</sup>。この低下におよぼす要因の1つとして、病斑部に侵入する土壌微生物、とくに糸状菌の *R. solani* に対する作用を明らかにしようと試みた。そのため、前報<sup>8)</sup>と同様に、インゲンの地上部を切除し、地下組織の枯死、分解を促した病斑と、切除しない病斑とについて、侵入する微生物数を比較し、病斑部から分離した糸状菌の *R. solani* に対する拮抗作用を調べた。

本研究のうち、分離菌の同定に関し醸酵研究所、横山竜夫博士を煩わせた。ここに心からの謝意を表する。

### 実験材料および実験方法

供試土壌は、北海道大学農学部農場の植壤土 (pH 5.0~

5.2) を 2 mm の篩でふるって使用した。供試植物は、インゲン (品種: 白金時) である。無殺菌土壌にインゲンを播種し、出芽後間もなく *R. solani* (B-5 菌株) を接種する。約 1 カ月後、インゲンの地上の茎葉部を地際より切除し、地下組織の枯死、分解を促進した。対照として、地上部を切除せずに、そのまま生育を続ける区を設けた。*R. solani* の接種は、酵母エキス加用 Czapek-Dox 培養液に 25°C、10 日間培養した菌体のホモジネートを用い、土壌に対し乾重比にして約 0.1% の割合で加えた。

土壌、根圏土壌、分解組織および病斑中の糸状菌、細菌および放線菌を稀釈平板法で数え、糸状菌は分離してのちの実験に供した。平板培地は、糸状菌、細菌、放線菌につき、それぞれ WAKSMAN 氏培地、THORNTON 氏培地、Glycerolasparagine 培地を用いた。病斑中の微生物の定量は、接種したインゲンの地上部を切除後、一定期間毎に地下の病斑部について行なった。すなわち、長さ約 3 cm の病斑を含む組織 5 個を 300 ml 容三角フラスコに入れた 100 ml の殺菌水で、5 回繰返し水洗した。水洗後、組織より殺菌ナイフで病斑をくり抜き、径約 3 mm の病斑 10 個を 10 ml の殺菌水と共にホモゲナイザーで碎き、これを稀釈平板の原液とした。

病斑中の糸状菌の分離は、上と同じ方法で取った同じ大きさの病斑を用い、そのまま培地上に並べる plate 法、1 個の病斑をペトリ皿の中で碎きそこに培地を注ぐ fragmentation 法の二つによった。いずれの方法も、25°C、3~5 日後に培地上に出現した糸状菌菌糸の先端を切り取り分離した。それぞれの方法から、50 ずつの菌を

分離し、PSA 斜面培地に培養、保存した。

根圏土壌の微生物の定量は、根部の土壌を軽く落したインゲン地下部を殺菌水中で5分間振盪した根圏土壌の懸濁液を用い、稀釈平板法により行なった。土壌と根圏土壌の糸状菌は、稀釈平板より数え、その菌叢を分離し、PSA 斜面培地に保存した。

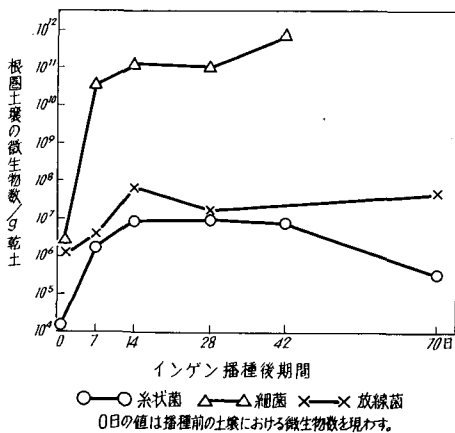
分解組織の微生物の定量は、病原菌を接種しないインゲンの地上部を切除後、一定期間毎に取り出した長さ約3cmの組織5個を、上と同じように水洗後、磨砕し、ガーゼでろ過した液を稀釈平板法により測定した。

病斑部から分離した9種の糸状菌について *R. solani* に対する拮抗作用を、対峙培養と病斑からの *R. solani* の分離抑制から比較した。対峙培養は、脱塩水寒天培地または Czapek-Dox 培地の中央に径1cmの *R. solani* の含菌寒天培地をうえ、両側に対峙して糸状菌を接種し、25°C に一定期間おいた後、*R. solani* の生育抑制および *R. solani* に対する寄生の有無を調べた。病斑からの *R. solani* の分離抑制程度は、Czapek-Dox 液を加えたパーミキュライトに糸状菌を培養し、それに *R. solani* の病斑部を含むインゲン胚軸部を入れ、一定期間後、病斑部から *R. solani* の再分離を行ない、その多少から比較した。

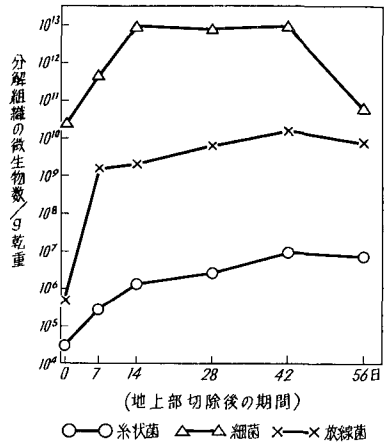
実験結果

1. 根圏土壌および組織の分解に伴う微生物数の変化

インゲン栽植前供試土壌の糸状菌、細菌および放線菌数は、乾土1g当たりそれぞれ  $1.4 \times 10^4$ ,  $2.6 \times 10^6$ ,  $1.4 \times 10^6$  であった(第1図)。この土壌に播種したインゲン根圏の微生物数は増加し、播種2~4週目に最高になり、糸状菌、細菌、放線菌はそれぞれ  $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  ずつ増加した。



第1図 インゲンの生育と根圏土壌の微生物数

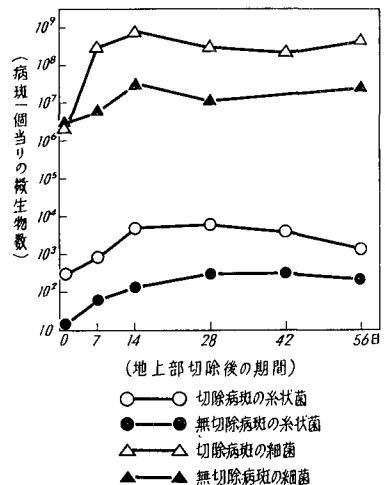


第2図 インゲン組織の分解と組織の微生物数

播種後約1カ月目にインゲンの地上部を切除すると、組織の枯死、分解に伴って組織中の微生物は増加し、2~6週目に最高になる(第2図)。この時期は、地上部を切除したインゲン地下部の皮層柔組織の分解が急激に起こっている時である<sup>8)</sup>。

2. 病斑中の微生物数の変化

インゲン胚軸部に形成された *R. solani* の局部病斑の古さと、その中に侵入する微生物数を、地上部を切除せずにそのまま生育させたインゲンと播種1カ月目に地上部を切除し、地下部の枯死を促したものとについて比較した(第3図)。地上部を切除しないインゲンの病斑中の微生物数は、病斑形成後2週目頃まで徐々に増加し、径約3mmの病斑中の糸状菌、細菌、放線菌はそれぞれ



第3図 罹病インゲン組織の分解に伴う病斑部の微生物数

1.3×10<sup>2</sup>, 3.1×10<sup>7</sup>, 1.4×10<sup>4</sup> になるが、その後は余り増減しない。これに対し、地上部を切除するとその病斑中の微生物数は、急激に増加し、2週間後には糸状菌、細菌それぞれ4.3×10<sup>3</sup>, 7.0×10<sup>3</sup> となり、無処理インゲンの病斑よりもはるかに多くなる。その後8週目頃まで著しい増減はない。放線菌の数は、細菌に比べはるかに少なく、磨碎組織懸濁液の稀釈平板上の細菌コロニーがはるかに多く、放線菌は生育が抑制されるため、その正確な数を求める事が困難であり、図から除いた。

以上二つの実験結果より、土壌中の微生物は、インゲン根圏で急激に増加し、またインゲン胚軸の病斑部の微

生物数も病斑が古くなると増加する。さらに、インゲンが衰弱、枯死すると、その地下部組織中の微生物数は著しく増加し、同時に病斑部の微生物数も急増する事がわかった。

### 3. 病斑部に侵入する糸状菌の種類とその割合

地上部を切除したインゲンと、切除しないものの病斑部の糸状菌の種類とその分離頻度を比較した。plate法とfragmentation法により、50菌株ずつ合計100菌株を分離し、同定したが、二つの方法により分離された糸状菌の種類や分離頻度にほとんど差が認められなかったのて、両方を合計した結果を各々、第1, 2表に示した。

第1表 病斑の古さと地上部を切除しないインゲンの病斑から分離される糸状菌

糸状菌	接種後の期間* (日)									
	2	7	14	21	28	42	56	70	112	
<i>Rhizopus arrhizus</i>			14**					6	6	
<i>Rhizopus oryzae</i>					2		1	2		
<i>Mucor hiemalis</i>			6		2	8		2	2	
<i>Fusarium oxysporum</i>	72	80	39	54	66	51	64	56	54	
<i>Fusarium solani</i>	8	8	1	18	16	6	2	20	8	
<i>Fusarium sp.</i>			9	14		2	6			
<i>Penicillium funiculorum</i>	8	6	2			4	9		2	
<i>Penicillium spp.</i>	8				4	9	1		2	
<i>Trichoderma viride</i>			28	8	2	17	12	4	8	
white sterile						1	1			
その他	4	6	1	4	8	6	5	10	18	

\* 接種はインゲン播種と同時に進んだ。

\*\* 数字は、各期間毎に分離した100菌株中の割合を表わす。

第2表 地上部を切除したインゲンの病斑部から分離される糸状菌

糸状菌	地上部切除後の期間* (日)							
	0	7	14	21	28	42	56	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	14**	16	8	3	3			
<i>Rhizopus oryzae</i>		3	9	1	2			
<i>Mucor hiemalis</i>	6	5	6	2	7			
<i>Fusarium oxysporum</i>	39	19	15	37	49	48	40	
<i>Fusarium solani</i>	1		6	21	9	14	6	
<i>Fusarium sp.</i>	9	3	3	1	2			
<i>Penicillium funiculorum</i>	2			1				
<i>Penicillium spp.</i>		5	1					
<i>Trichoderma viride</i>	28	35	50	32	16	32	42	
その他	1	15	4		4	2	2	

\* 播種後約4週目にインゲン地上部を切除した。

\*\* 数字は各時期毎に分離した100菌株中の割合を表わす。

表には示してないが、土壌および根圏土壌の糸状菌を稀釈平板より分離すると、いずれも *Fusarium* および *Trichoderma* が多く、それぞれ14~38%, 2~24% を占め、*Penicillium*, *Mucor* などが10% 前後でこれに続いて多かった。

病斑部の糸状菌は、*Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* などであるが、そのうち *Fusarium* は土壌や根圏土壌に比べ、著しく多く39~72% を占めた。地上部を切除したのち、病斑から分離される糸状菌は、切除しないものと比べ *Trichoderma* が著しく多くなり、16~50% を占めた。

以上のように、供試土壌や根圏土壌の糸状菌のうち、*Fusarium*, *Trichoderma* などが病斑部に侵入し、地上部を切除後、組織の分解が始まると病斑部に *Trichoderma* が著しく多くなる。

#### 4. 糸状菌の拮抗作用

##### i) 培地上の対峙培養による拮抗作用

病斑部から分離した糸状菌のうち、9種を用い、*R. solani* に対する生育抑制と寄生作用を調べた。生育抑制は、対峙培養により5日後に両菌の菌叢が交わらず *R. solani* の生育が抑制されるものを+、互に交わるが *R. solani* の生育が抑制される場合を±、全く抑制の見られない場合を-として現わした。寄生作用は、対峙後4~6日目に両菌の菌叢の交わった部分をアニリンブルーで染色し、検鏡した。

第3表に示すように、*R. arrhizus* や *M. hiemalis* は、*R. solani* の生育を全く抑制しない。*F. oxysporum*, *F. solani*, *T. viride* の菌叢は、*R. solani* と交わり、菌糸の生育をやや抑制した。また、*Penicillium sp.* と *P. funiculorum* は明らかな阻止帯をつくり、*R. solani* の

第3表 病斑部から分離した糸状菌の対峙培養における *R. solani* 菌糸生育の抑制

対峙した糸状菌	<i>R. solani</i> 菌株		
	B-5	F-15	F-20
<i>Rhizopus arrhizus</i>	-*	-	-
<i>Mucor hiemalis</i>	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	±	±	±
<i>Fusarium solani</i>	±	±	±
<i>Penicillium funiculorum</i>	+	+	+
<i>Penicillium sp.</i>	+	+	+
<i>Trichoderma viride</i>	±	±	±
white sterile	-	-	-

\* - 生育抑制なし

± 菌叢は交わるが、*R. solani* の生育が抑制

+ 明らかな阻止帯形成

生育を強く抑制した。

糸状菌菌糸の *R. solani* に対する寄生は、培地の種類により異なった。すなわち、*F. oxysporum* と *F. solani* は脱塩水寒天培地では寄生を示さなかったが、Czapk-Dox 培地では *R. solani* 菌糸内に吸器様体を形成した。*T. viride* の菌糸は、*R. solani* 菌糸にまきつき、菌糸内へ侵入する。いずれも、寄生をうけた *R. solani* 菌糸は、収縮あるいは褐変するなど異状を呈し、細胞内容を消失し死ぬ。*Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* による寄生は見られなかった。また逆に、*R. solani* 菌糸が *Rhizopus*, *Mucor* 菌糸内に侵入し、寄生するのが見られた。

##### ii) 病斑部からの *R. solani* の再分離におよぼす糸状菌の作用

病斑部より分離した糸状菌が、病斑部でも *R. solani*

第4表 *R. solani* 菌糸に対する糸状菌の寄生

糸状菌	脱塩水寒天培地			Czapek-Dox 培地		
	B-5	F-15	F-20	B-5	F-15	F-20
<i>Rhizopus arrhizus</i>	-*	-	-	-	-	-
<i>Mucor hiemalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Fusarium solani</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Penicillium funiculorum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	?	?	?	-	-	-
<i>Trichoderma viride</i>	+	+	+	+	+	+
white sterile	-	-	-	-	-	-

\* + *R. solani* 菌糸に寄生する

- *R. solani* 菌糸に寄生しない

第5表 病斑からの *R. solani* の分離に  
およぼす糸状菌の作用

接種糸状菌*	病斑からの分離率 (%)	
	<i>R. solani</i>	糸状菌**
<i>Rhizopus arrhizus</i>	95	53
<i>Mucor hiemalis</i>	85	10
<i>Fusarium oxysporum</i>	88	100
<i>Fusarium solani</i>	87	100
<i>Penicillium funiculorum</i>	8	100
<i>Trichoderma viride</i>	68	67
white sterile	81	56
対 照	100	—

\* *R. solani* 病斑をうめたパーミキュライトに接種した糸状菌

\*\* 病斑より分離された接種菌

に拮抗作用を示すかを調べた。上記糸状菌を10日間培養したパーミキュライト中に入れたインゲン罹病組織の病斑部より、*R. solani* と糸状菌の分離を行なった。糸状菌を接種しないパーミキュライトに入れたインゲン罹病組織を対照とした(第5表)。

対照の病斑から *R. solani* は100%分離された。*R. arrhizus*, *M. hiemalis*, *F. oxysporum*, および *F. solani* を培養したパーミキュライトに入れた病斑からの *R. solani* の分離率は高く、これらの菌は病斑中の *R. solani* に対し、ほとんど抑制効果はないものと認められる。これに比べ、*T. viride* 接種区は分離率がやや低く、ある程度の抑制があると認められる。*P. funiculorum* は、病斑部からの *R. solani* の分離を著しく抑制し、*R. solani* の分離率は8%にすぎなかった。本実験では、病斑部からの *R. solani* の分離率の低下は、糸状菌が病斑内に侵入し、*R. solani* を抑制したのか、培地上に伸び出す時に競合を起した結果かは明らかでない。

この実験から、*Penicillium* は何れかの場面で *R. solani* に対し影響をおよぼすものと考えられる。

## 論 議

土壌伝染性植物病原菌である *R. solani* は、土壌中における生存に寄主植物に対する依存性が強いとされ<sup>5)</sup>、植物の生育中は病斑内で他の微生物との競合が少ない状態で生存すると考えられる。*R. solani* は、インゲン幼苗の胚軸部に侵入し、茶褐色の局部病斑を形成するが、侵入後間もなく生育は停止し、インゲン生育中は菌糸の生育は抑制されている<sup>3,8,9)</sup>。インゲンを栽培後、根圏の

土壌微生物は急増し、その一部は病斑部に侵入し、病斑組織中の病原菌は純粋に生存しているのではない。病斑の微生物は、その形成後次第に増加する。播種1カ月目に地上部を切除し、寄主植物の地下組織の衰弱、枯死を促すと、*R. solani* は直ちに病斑部から内部組織に伸び出し、腐生的に増殖し、維管束細胞内にも菌核を形成する<sup>8)</sup>。一方病斑中の微生物は急増し、これとともに病斑からの *R. solani* の分離率は急激に減少する。

供試土壌には、*Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor* などが多く、これらのうち *Fusarium*, *Trichoderma* は病斑部に侵入する主なものである。アマ茎に腐生的に着生する *Pythium*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Sclerotium* など30種余りの糸状菌<sup>6)</sup>とはやや趣をこととする土壌や根圏土壌の糸状菌相に対し、インゲン病斑部の糸状菌相には特異的なものはなかった。しかし、分離法や分離培地が限られているため、この結論はなお検討を要する。地上部を切除したインゲンと、切除せずにそのまま生育を続けたものの病斑の糸状菌相はほとんど変わらなかったが、前者は *Trichoderma* が著しく多く、後者は *Fusarium* が多かった。

これら糸状菌の *R. solani* に対する拮抗作用をみると、対峙培養で *P. funiculorum* は著しく *R. solani* の菌糸生育を抑制し、*Fusarium*, *Trichoderma* はこれに次いだ。*Fusarium* と *Trichoderma* は、*R. solani* の菌糸に寄生し、その収縮、褐変などを起こした。このことは、*Trichoderma*<sup>11)</sup>, *Papulospora*<sup>10)</sup>, *Penicillium*<sup>1)</sup> が、*R. solani* の寄生菌とされることと同じである。*Mucor* と *Rhizopus* が生育抑制を示さなかったのは、鈴木・宇井(1964)のアマ茎上で、*R. solani* と藻菌とは競合関係が弱いとしたことと同じである。また、逆に *R. solani* は藻菌類など他の糸状菌に寄生する事実も知られている<sup>2)</sup>。植物遺体分解の過程における微生物遷移にあって、一番初めに基質に着生する藻菌類にこれより遅く着生する *R. solani* が寄生し、後から続く糸状菌が *R. solani* に寄生するという糸状菌間の寄生関係は、微生物遷移過程で起こる拮抗作用の1つと見なすことが出来る<sup>7)</sup>。

病斑部より分離した糸状菌を培養したパーミキュライトの中に *R. solani* のインゲン罹病組織片を入れると、*R. solani* の病斑からの分離率が *P. funiculorum* により著しく低下し、*T. viride* によってもわずかに抑制が見られた。これら糸状菌が、病斑内でも *R. solani* を抑制するかどうかは不明であるが、病斑が古くなったり、分解する間に病斑からの *R. solani* の分離率の低下に、このような糸状菌が作用しているものと考えられる。

## 摘 要

1) *R. solani* によるインゲンの病斑が古くなると、病原菌の分離率が低下する。これに対する病斑部に侵入した微生物、とくに糸状菌の関係を検討した。

2) インゲン根圏で著しく増加した土壌中の糸状菌と細菌は、インゲン地下部に生じた *R. solani* の病斑部からも分離される。

3) インゲンの衰弱、枯死に伴いインゲン組織中の微生物は急増し、同時に病斑部でも著しく多くなる。

4) 生育中のインゲンの病斑部に侵入する糸状菌は、*Fusarium* が最も多く、*Trichoderma* がこれにつき、*Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* なども分離される。地上部を切除し、衰弱、枯死したインゲンの病斑には、とくに *Trichoderma* が多くなる。

5) in vitro における *R. solani* 菌糸の生育抑制作用は、*P. funicularum* が最も強く、*T. viride*, *F. oxysporum*, *F. solani* はこれよりはるかに劣り、*Rhizopus*, *Mucor* は全く抑制しなかった。*Fusarium* は *R. solani* の菌糸に侵入し、吸器様体を形成する。*Trichoderma* は菌糸にまきつき、のち侵入する。*R. solani* は、逆に *Rhizopus* や *Mucor* の菌糸に寄生する。

6) 病斑から分離した糸状菌をパーミキュライトに培養し、これにインゲンの罹病組織片を入れ、一定期間後に病斑より *R. solani* を再分離すると、その分離率は *P. funicularum* により最も低くなり、*Trichoderma*, *Fusarium* は著しい低下を起こさなかった。

## 引用文献

- 1) BOOSALIS, M. G. (1954): *Phytopathology*, **44**: 482 (Abst.).
- 2) BUTLER, E. E. (1957): *Mycologia*, **49**: 354-373.
- 3) CHRISTOU, T. (1962): *Phytopathology*, **52**: 381-389.
- 4) GARRETT, S. D. (1956): *Biology of root-infecting fungi*. pp. 293 Cambridge University Press, London and New York.
- 5) SANFORD, G. B. (1952): *Can. J. Bot.*, **30**: 652-664.
- 6) 鈴木孝仁・宇井格生 (1964): *土と微生物*, **6**: 1-8.
- 7) 宇井格生 (1965): *土壌病害の手引 III*, 土壌病害対策委員会, 東京.
- 8) 宇井格生・本間善久 (1973): *日本植物病理学会報投稿中*
- 9) VAN ETEN, H. D., P. D. MAXWELL and D. F. BATEMAN (1967): *Phytopathology*, **57**: 121-126.
- 10) WARREN, J. R. (1948): *Mycologia*, **40**: 391-401.
- 11) WEINDLING, R. (1932): *Phytopathology*, **22**: 837-845.

## Résumé

The microorganisms were isolated from the lesion of *Rhizoctonia solani* Kühn on bean stems. The number of microorganisms in the tissue and lesion was increased with its decay by shoot removal. The most prevalent fungi isolated from lesion of intact bean plant was *Fusarium*, while those from shoot removed plant was *Trichoderma*. Other fungi such as *Rhizopus*, *Mucor* and *Penicillium* were also isolated from the lesion of both lesions.

The antagonistic action of the fungi to *R. solani* was examined on agar plates. Among them, the mycelial growth of *R. solani* was remarkably inhibited by *Penicillium* and scarcely by *Fusarium* and *Trichoderma*. *Fusarium* and *Trichoderma* was parasitic to the hyphae of *R. solani*. The hyphae of the former often coiled the hyphae of *R. solani*, while the latter invaded directly with haustorium into the hyphae of *R. solani*. Conversely, *R. solani* was the parasite of *Rhizopus* and *Mucor* which did not suppress the hyphal growth of host fungi. The isolation of *R. solani* from the lesions on bean stems which were incubated in the vermiculite inoculated with various fungi, was remarkably suppressed by *Penicillium*.