

# Rhizoctonia solani における菌糸融合 による分類の現状

北海道医療大学歯学部 <sup>くに</sup> 国 <sup>なが</sup> 永 <sup>し</sup> 史 <sup>ろう</sup> 朗

## はじめに

*Rhizoctonia solani* は、多様な生存様式をとる種内群からなる「複合種」である。植物病原菌をはじめ、腐生性の強い菌、またラン科植物の菌根菌と考えられるものまで存在する。

本菌の分類で最も注目されるのは菌糸融合による類別である (PARMETER et al., 1969; 生越, 1972)。本菌の多様性とユニークさを統一的に把握できる手法として、今日、世界的に広く採用されている類別法である。近年に入り分子生物学的な技法と出会い、この手法によって類別される菌糸融合群と亜群はそれぞれ遺伝的に独立した集団であることが証明され、遺伝的な関係をも表わす重要な分類手段となっている。

本稿では、*R. solani* の菌糸融合による類別の現状を紹介する。また PCR 法を応用した亜群の識別法が開発されているので、その特異的プライマー配列を紹介する。

## I *R. solani* の菌糸融合群の類別意義

現在、本菌種は菌糸融合の類別により 13 の菌糸融合群 (AG: 菌群) とそれらに含まれる 20 の亜群 (sub-group) とに分けられる (表-1)。その表記は、菌群番号について亜群名を併記する形となっている (SNEH et al., 1991)。

菌群はそれぞれ遺伝的に異なる個体群であり、亜群は各菌群内に存在するさらに遺伝的に分化した個体群であると考えられている (VILGALYS and CUBETA, 1994; KUNINAGA, 1996)。しかし AG-2 の亜群についてはその関係は複雑である。2-2 IIIB, IV および LP は相互に遺伝的に近縁な関係にあるが、その他の亜群はそれぞれ独立した一つの菌群と見なせるほどに遺伝的・系統的に隔たっていることがわかっている (CARLING et al., 2002)。

現在、*R. solani* による病害は日本植物病名目録におよそ 230 記載されており、その病名の種類は 20 以上に

及んでいる。しかし、菌群や亜群ごとに宿主植物の種類や病害名をみると一定の関係が認められる (表-1)。たとえば AG-1 の IA は紋枯病や葉腐病、IB はくもの巢病が多い。一般に地上部を侵す傾向がある。AG-2 は多数の亜群の存在を反映し、各種植物でいろいろな部位を侵す傾向を示し、葉腐病、紋枯病、芽枯病、苗立枯病、茎腐病、根腐病などのさまざまな病名が付けられている。AG-3 はナス科植物の病害と深い関係を示し、AG-4 は各種植物で出芽前および出芽後の苗立枯病を起こす特性を示す。

菌群や亜群は、それぞれ固有の生態的地位を占めていることは明らかである。したがって、本菌の病害防除を効果的に行う上で分離菌の菌群所属をまず認識することが重要であることを、ここで改めて強調したい。

## II *R. solani* の菌群および亜群類別の現状

菌群は、菌糸融合の反応に基づき決定される。一方、亜群は基本的には菌糸融合の現象とは関係のない概念であり、現在、培養型やその他のさまざまな生化学的手法により決定される。これらの類別は現在どのようにして行われているかを以下に説明する。

### 1 菌群の同定

菌糸融合の反応は四つの融合反応カテゴリー、すなわち C3, C2, C1, C0 からなる。

C3 あるいは C2 反応が観察される場合は、同一菌群と同定される。C1 反応の場合は、同一菌群か、あるいは異なる菌群かに同定される。C0 の場合は、明らかに異なる菌群として同定される (CARLING, 1996)。

それぞれの融合反応カテゴリーの特徴およびその反応のもつ遺伝的な意味を以下に説明する。

C3 は、菌糸細胞の融合に続いて原形質の連絡が起き、細胞死の認められない反応である。遺伝的に同一な個体間で生じる体細胞和合性反応であると理解されている。

C2 は、菌糸の細胞壁や膜が接触融合し、続いて原形質の連絡が起き、細胞の死が広範囲に生じる反応である。同一菌群の遺伝的に異なる個体間で生じる体細胞不和合性反応であると考えられている。

C1 は、菌糸の細胞壁や膜が接触するのみで、原形質

Current Situation of the Taxonomy of *Rhizoctonia solani*.  
Shiro KUNINAGA

(キーワード: *Rhizoctonia solani*, 菌糸融合群, 亜群, PCR 診断法)

表-1 *Rhizoctonia solani* の菌糸融合群, 亜群および主要な病害名

菌糸融合群	亜群	病害名
AG-1	IA	イネ紋枯病, トウモロコシ紋枯病, イネ・マメ科牧草葉腐病
	IB	樹木苗くもの巢病, リンゴくもの巢病, ミツバ立枯病, レタスすそ枯病
	IC	各種作物苗立枯病 (自然発生?)
	ID <sup>a)</sup>	コーヒーの necrotic leaf spot <sup>b)</sup>
AG-2	1	アブラナ科作物苗立枯病, チューリップ葉腐病, イチゴ芽枯病
	2 IIIB	イネ褐色紋枯病, ベントグラス葉腐病 (通称ブラウンパッチ), イグサ紋枯病, ゴボウ黒あざ病, エンドウ茎腐病
	2 IV	テンサイ葉腐・根腐病, ニンジン根腐病
	2 LP	シバ葉腐病 (通称ラージパッチ)
	3	ダイズ葉腐病
	4 <sup>a)</sup>	
	BI	
AG-3	PT	ジャガイモ黒あざ病
	TB <sup>a)</sup>	タバコ斑点病 <sup>b)</sup>
	?	トマト葉腐病, ナス褐色斑点病
AG-4	HG-I	各種作物苗立枯病, 草花類苗立枯病, カンキツ類苗立枯病
	HG-II	ホウレンソウ株腐病, テンサイ苗立枯病
	HG-III <sup>a)</sup>	
AG-5		ダイズのリゾクトニア根腐病, アズキのリゾクトニア根腐病, ジャガイモ黒あざ病
AG-6	HG-I	
	GV	
	?	コムギの crater disease <sup>b)</sup> , リンゴの根腐症 <sup>b)</sup>
AG-7		
AG-8 <sup>a)</sup>		コムギ bare patch 病 <sup>b)</sup>
AG-9	TP <sup>a)</sup>	
	TX <sup>a)</sup>	
AG-10 <sup>a)</sup>		
AG-11 <sup>a)</sup>		ルーピン胚軸腐れ症 <sup>b)</sup> , 小麦葉鞘腐れ症 <sup>b)</sup>
AG-12 <sup>a)</sup>		
AG-13 <sup>a)</sup>		

a) 我が国では現在のところ分離されていない菌群あるいは亜群, b) 我が国では未発生の病害。

連絡はなく, 接触した部分の狭い範囲で細胞死が起きる反応である。一般に, AG-2の亜群間あるいはAG-2とAG-8の間で観察されることが多い。この反応の遺伝的意味はいまだ不明であるが, 近年のDNA解析により, この反応を示すものは遺伝的に必ずしも近縁な関係にあるものではないと考えられている。

C0は, 菌糸融合の現象がまったく起きないものである。

## 2 亜群の同定

培養型, 病原性, チアミン要求性, DNA-DNA分子交雑法, rDNA-ITS RFLP解析法, 脂肪酸組成比較法およびrDNA-ITS塩基配列比較法などの種々の手法により決定される。

菌糸の融合頻度は, AG-2の亜群識別には基本的に有効であるが, それ以外の菌群の亜群では識別に利用できない。

現在, 最も信頼性の高い亜群の識別法は, rDNA-ITS塩基配列比較法と脂肪酸組成比較法である。しかし, この2つの方法はどの研究施設でも常用できる手法ではない。ここでは実用面を考慮して特異的PCRプライマーを用いた識別法を推奨したい。表-2に記したプライマー配列は, rDNA-ITSの塩基配列データを基に筆者が設計したものである。今日, 遺伝子増幅装置はいろいろな研究機関に急速に普及していることを考えると, 現時点において最も簡便かつ客観的に亜群を評価できる手法であると考えられる。なお, このプライマーは特定の亜群のみを増幅させ, その他の菌群や亜群を増幅させないので, もちろん菌群の同定にも使用することが可能である。

ここでは, 農業上特に重要な亜群を含むAG-1~4について, PCR法以外の培養型比較などの実用的なものを中心に, その亜群識別の現状を紹介する。

表-2 *Rhizoctonia solani* AG-1, AG-2, AG-3 および AG-4 の亜群識別のための PCR 反応<sup>a,b)</sup> と特異的プライマー配列<sup>c)</sup>

菌群/亜群	特異的プライマー塩基配列 (5'-3')		アニーリング温度 (°C)	増幅サイズ (bp)
AG-1 IA	(F) CCTTAATTTGGCAGGAGGG	(R) GACTATTAGAAGCGGTTCA	58	540
AG-1 IB	(F) TGTAGCTGGCCTTTTAAC	(R) GGACTATTAGAAGCGGTTCCG	58	580
AG-1 IC	(F) GAGTTGTTGCTGGCCTCTGG	(R) CCAAGTCAATGGACTATTG	58	550
AG-1 ID	(F) TGGAGTTTGGGCAAGTG	(R) GGACTATTAGAAGCGGTTCCG	58	510
AG-2-1	(F) CAAAGGCAAT(A/G)GGTTATTGGAC	(R) CCTGATTTGAGATCAGATCATAAAG	60	480
AG-2-2 IIIB	(F) AGGCAGAG(A/G)CATGGATGGGAG	(R) ACCTTGGCCA(A/C)CCTTTTTTATC	62	500
AG-2-2 IV	(F) AGGCAGAGACATGGATGGGAA	(R) CTTGGCCACCC(A/C)TTTTTTTAC	62	500
AG-2-2 LP	(F) AGGCAGAGAAAACATGGATGGGC	(R) CCTCAATACCAAAGTAAACCAAATC	62	400
AG-2-3	(F) GTAGCTGGCTCATCGTTCTT	(R) CATTTCCCTTGGCCACCTTTG	60	530
AG-2-4	(F) GGGGAATTTATTTGTTGTTTTTGTAAATAG	(R) CAATGGACTATTAGAAGCA	55	440
AG-2 BI	(F) GAATGAAG(C/T)AATC(A/G)GGGAACC	(R) GATCATAAAAATATTGTCCAAGCT	55	510
AG-3 PT	(F) GTTTGGTTGTAGCTGGTCT	(R) CTGAGATCCAGCTAATAC	65	470
AG-3 TB	(F) GTTTGGTTGTAGCTGGCCC	(R) CTGAGATCCAGCTAATGT	65	470
AG-4 HG-I	(F) GGACCTACTCTC(C/T)TTGG	(R) ACAGGGTGTCTCAGCGA	55	420
AG-4 HG-II	(F) GGACCTTCTACTCCCCT	(R) ACAGGGTGTCTCAGCGA	55	420
AG-4 HG-III	(F) GTTGTAGCTGGCATTTC	(R) CCACCCCTCCCAAACCTCT	58	560

a) PCR 反応の条件: (1)94°C, 2分 (2)94°C, 40秒 (3)各アニーリング温度, 1分 (4)72°C, 1分 (5)(2)~(5)を30サイクル, (6)72°C, 5分 (7)4°C. b) PCR 反応液(50 µl): 鋳型 DNA 50-80 ng, 各プライマー 5 pmole, dNTP 各 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 反応バッファ ×1, DNA ポリメラーゼ 2.5 U. c) (F)は Forward プライマー配列, (R)は Reverse プライマー配列.

(1) **AG-1**: IA, IB, IC および ID の亜群からなる。ID は最近記載された、コーヒー葉に壊死斑点を起こす病原菌系である (PRIYATMOJO et al., 2001)。

四つの亜群は、基本的には PDA 上の菌核の形状を比較することで識別することができる。菌核の特徴は以下のとおりである。

IA の菌核は球~類球形、褐色~暗褐色を呈し、大きさ 2~5 mm, 散生あるいは数個連生し、その表面は平滑である。IB は扁球形、褐色を呈し、大きさ 1~5 mm, 盤状あるいは散生し、菌核表面は粗く、短毛を有し、毛羽立っている。IC は球~類球形、暗褐色~黒褐色を呈し、大きさ 0.2~0.8 mm, 散生し、菌核表面は平滑である。ID は扁球形、黄褐色~褐色を呈し、大きさ 0.3~1 mm, 散生し、菌核表面は粗く、短毛を有する。

菌糸生育比較でも一部識別可能であり、IB は 35°C でほとんど生育できないが、その他のものは好高温性を示し、生育することができる。しかし、以上の類別作業でも識別が困難な場合は、表-2 の PCR プライマーを使用して同定することが可能である。

(2) **AG-2**: 現在、七つの亜群からなる (表-1)。このうち 2-2 LP (ラージパッチ病菌系; HYAKUMACHI et al., 1998), 2-3 (グイズ葉腐病菌系; NAITO and KANEMATSU, 1994), 2-4 (CARLING et al., 2002) および 2 BI (AG-BI とされていたもの; CARLING et al., 2002)

は、いずれも最近記載された亜群である。

本菌群の亜群識別は最も難しい。2-1 と 2-2 は、当初は菌糸融合の頻度で類別されていた。その後、融合頻度のみでは類別できない場合のあることがわかり、現在は融合頻度と同時に融合反応カテゴリーも観察して類別が行われている。

2-2 内の亜群間では C2 が多く観察される。しかし、一般に異なる亜群間では C1 が多く、C2 が少ない傾向を示す。したがって、菌糸融合の頻度が高くても、その融合の多くが C1 である時は、ほとんどの場合異なる亜群として同定される。なお、この観察では複数の亜群既知株を用いる必要がある。

通常、以上の融合観察を行い、続いて培養性質などを検討して総合的に判断して亜群の決定が行われる。しかし、本菌群には多数の亜群があり、また培養性質だけでは識別の難しいものが多いので、本菌群については表-2 の PCR プライマーを用いて最終的に同定することを薦める。

培養性質 (PDA) で識別の参考になるものを以下に特記する。2-1 は小さな赤褐色の菌核を輪帯状に形成する。2-3 や 2 BI もこれと類似する培養型をもつが、2-1 と 2 BI は高温 (30°C) では生育が極めて不良であり、2-3 は生育できるので区別できる。2-1 と 2 BI はチアミン要求性で識別でき、前者は非要求性、後者は要求性である。2-2 については、IIIB は輪帯状に菌糸が極めて密

になる培養型を示すものが多い。LPは輪帯状のものを形成せず、気中菌糸の多い培養型を示す。一方、IVは培養型のみではIIIBやLPと区別するのは難しい場合が多い。また、2-2は菌株保存中に気中菌糸の多い培養型となることが多いので注意が必要である。

そのほかIIIBは35°Cで菌糸生育できるが、IVとLPはほとんど生育できないので識別することができる。

(3) AG-3:二つの亜群, PT (Potato type) と TB (Tobacco type) からなる (KUNINAGA et al., 2000)。

これらの亜群は、基本的には培養型や病原性比較で識別することができる (STEVENS JOHNK et al., 1993)。しかし、最終的に類別が困難な場合は、PCR診断法を利用することができる。

2亜群の培養型(PDA)は、一般にPTは培養後期になると培地着色が黄褐色～黒褐色となるのに対して、TBはオリーブ色がかかった黄褐色となり、強い褐色とはならない傾向がある。また、TBには輪帯状に菌糸の濃密な層を形成するものが多い。

病原性については、2亜群は明確な寄生性の分化を示す。PTはジャガイモの新芽や根に病原性を有し、タバコ子苗には病原性を示さない。一方、TBはタバコには病原性を示すが、PTは示さない。

(4) AG-4: HG-I (Homogeneous group-I), HG-II および HG-III の3亜群からなる。HG-IIIは最近記載されたものである (STEVENS JOHNK and JONES, 2001)。

3亜群は、培養性質により基本的に識別することができる (STEVENS JOHNK and JONES, 2001)。しかし、HG-IIとHG-IIIを確実に識別するには、現在のところPCR診断法(表-2)を利用する必要がある。

PDA上では、いずれの亜群も本菌群特有の菌叢表面が粉状となる、いわゆる「降霜状」の培養型を示す。しかし、培養後期になると培地着色の様子が異なる。一般にHG-Iは、褐色～黒褐色となる傾向が強いのにに対して、HG-IIとHG-IIIは淡褐色～淡紫灰色となる。菌核形成はHG-IとHG-IIはあまり顕著ではないが、HG-IIIはオリーブ色を帯びた茶褐色の微小な菌核を比較的多数形成する傾向がある。しかしながら、一般にHG-

IIとHG-IIIを培養型から識別するのは難しい。

rDNA-ITS RFLP解析法では、HG-Iは制限酵素 *HinCII* で切断されるが、HG-IIとHG-IIIは切断されないで、後者の2亜群は識別できない。

## おわりに

*R. solani* の菌群あるいは亜群は、それぞれ「生物学的種」に相当すると考えられている。しかしながら、日本植物病名目録には、本菌の病害でこれらの類別群が記載されているものは、その全体の3割弱に過ぎない。近年報告される新病害では、ほとんどのもので菌群が明記されているが、亜群についてはまだ非常に少ない。その理由として、そもそも亜群の識別が難しいこと、また有用な識別法は実用的でないものが多いことなどがあげられる。本稿においてPCR法による識別法を紹介させていただいたが、これが今後、亜群記載が増えていく端緒となるならば幸いである。

## 引用文献

- CARLING, D. E. (1996): *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. (eds. Sneh, B., S. Jabaji-Hare, S. Neate and G. Dijst), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 37~47.
- et al. (2002): *Phytopathology* **92**: 43~50.
- HYAKUMACHI, M. et al (1998): *Plant Pathology* **47**: 1~9.
- KUNINAGA, S. (1996): *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. (eds. Sneh, B., S. Jabaji-Hare, S. Neate and G. Dijst), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 73~80.
- et al. (2000): *J. Gen. Plant Pathol.* **66**: 2~11.
- NAITO, S. and S. KANEMATSU (1994): *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **60**: 681~690.
- 生越 明 (1972): *ibid* **38**: 117~122.
- PARMETER, J. R. Jr. et al., (1970): *Phytopathology* **59**: 1270~1278.
- PRIVATMOJO, A. et al. (2001): *ibid.* **91**: 1054~1061
- SNEH, B et al. (1991): Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 133 pp.
- STEVENS JOHNK, J. et al. (1993): *Phytopathology* **83**: 854~858.
- and R. K. Jones (2001): *ibid.* **91**: 821~830.
- VILGALYS, R. and M. A. CUBETA (1994): *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 135~155.